

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



05-10-01

GAU 1646

#8
DOST
5-15-01Express Mail No. EL 451 596 778 US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

MAY 14 2001

TECH CENTER 1600/2900

Application of: Dear *et al.*

Group Art Unit: 1646

Serial No. 09/486,247

Examiner: To be assigned

Filing Date: 25 May 2000

Attorney Docket No.:
8484-081-999

For: PROTEASE-RELATED PROTEIN

COMMUNICATION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicants submit herewith a certified copy of German Patent Application No.

P 197 36 198.6 and a certified English translation of German Patent Application No.

P 197 36 198.6, respectively.

Applicants believe that no fee is due with this paper. However, if it is determined that a fee is due, please charge the required fee to Pennie & Edmonds LLP Deposit Account No. 16-1150 (order no. 8484-081-999). A copy of this sheet is enclosed.

Respectfully submitted,

Dated: May 8, 2001

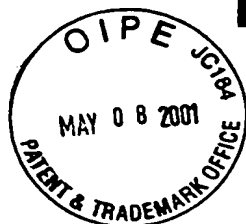
Nathan A. Machin 47,763
Nathan A. Machin (Reg. No.)

For: Laura A. Coruzzi (Reg. No. 30,742)

Pennie & Edmonds LLP

1155 Avenue Of The Americas

New York, New York 10036



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

RECEIVED

MAY 14 2001

TECH CENTER 1600/2900



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 197 36 198.6

Anmeldetag: 20. August 1997

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts,
Heidelberg, Neckar/DE

Bezeichnung: Protease-verwandtes Protein

IPC: C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. März 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Sieck



7

- 1 -

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
"Protease-verwandtes Protein"
Unser Zeichen: K 2398 - hu / km

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protease-verwandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Eine Haaranomalie ist häufig durch eine gestörte Keratinisierung des Haares bedingt. Aus Untersuchungen mit Nacktmäusen ist bekannt, daß das Genprodukt eines mit whn bezeichneten Gens für die Keratinisierung des Haares wichtig ist. Dieses Genprodukt ist ein Transkriptionsfaktor. Seine Zielgene sind allerdings nicht bekannt. Insofern ist es nicht möglich, in die Keratinisierung des Haares einzugreifen. Dies wäre aber wünschenswert, insbesondere wenn die Keratinisierung des Haares gestört ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Keratinisierung des Haares untersucht und gegebenenfalls reguliert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protease-verwandtes Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß das Genprodukt des whn-Gens für die Regulation der Expression von mindestens drei

- 2 -

Genen verantwortlich ist. Zwei dieser Gene kodieren für die bekannten Keratine Ha3 (vgl. Winter, H. et al., Exp. Cell Res. 212 (1994), 190-200) bzw. CK15 (vgl. Nozaki, M. et al., Gene 138 (1994), 197-200). Das dritte Gen kodiert für ein Protein, das Homologien zu einer Protease der Kallikrein-Familie, gegebenenfalls eine Protease-Aktivität aufweist, sich aber von einer bekannten Protease der Kallikrein-Familie auf dem DNA-Level durch Hybridisierung unter üblichen Bedingungen unterscheidet. Ein solches Protein weist die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz auf. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß bei Fehlen des Genprodukts des whn-Gens die Gene von Ha3 und CK15 unter-

exprimiert sind, während das Gen vorstehenden Proteins überexprimiert ist.

In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "Protease-verwandtes Protein" (PVP) bezeichnet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein (PVP) kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Ein Abschnitt der DNA von Fig. 1 wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als pRDA2-1a unter DSM 11522 am 23.

April 1997 hinterlegt.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

5

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, mRNA aus Hautzellen von whn(+/+)- bzw. nu/nu(whn(-/-))-Mäusen zu isolieren, die mRNA in cDNA umzuschreiben und die cDNA einem "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahren (vgl. Hubank, M. and Schatz, D., Nucleic Acids Research 22 (1994), 5640-5648) zu unterziehen, wodurch jene cDNA identifiziert wird, die in nu/nu-Mäusen im Vergleich zu whn(+/+)-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird. Insbesondere letztere cDNA stellt eine erfindungsgemäße cDNA dar.

10

15

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, angegeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

20

25

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen Ltk⁺, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

30

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fu-

- 4 -

sionsproteins exprimiert werden kann.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, die Keratinisierung des Haares zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (PVP) in Zellen, insbesondere Hautzellen, nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung von (PVP) zur Keratinisierung des Haares hergestellt werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (PVP) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (PVP) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, regulierend in die Keratini-

sierung des Haares einzugreifen. Diese Regulierung kann positiver oder negativer Art sein. Als positive Regulierung ist jene zu verstehen, mit der einer gestörten Keratinisierung des Haares begegnet werden kann. Eine negative Regulierung würde vorliegen, wenn eine normale bzw. starke Keratinisierung des Haares abgeschwächt wird.

Für eine positive Regulierung der Keratinisierung des Haares bietet es sich an, (PVP) in Form eines es inhibierenden Stoffes zu verwenden. Dieser Stoff kann ein erfindungsgemäßer Antikörper sein. Ferner kann er ein Anti-Sinn-Oligonukleotid sein, das sich zur Expressions-Inhibierung des für (PVP) kodierenden Gens eignet. Desweiteren kann der Stoff ein solcher sein, der zu (PVP) antagonistisch wirkt. Von Vorteil kann es sein, wenn mehrere der Stoffe verwendet werden. Besonders günstig kann es sein, wenn zusätzlich ein oder mehrere der Proteine Ha3 und CK15 als solche oder in Form von sie exprimierenden Nukleinsäuren verwendet werden.

Für eine negative Regulierung der Keratinisierung des Haares bietet es sich an, (PVP) als solches oder in Form einer es exprimierenden Nukleinsäure zu verwenden. Von Vorteil kann es sein, wenn zusätzlich ein oder mehrere der Proteine Ha3 und CK15 in Form von sie inhibierenden Stoffen verwendet werden. Solche Stoffe können gegen Ha3 bzw. CK15 gerichtete Antikörper oder Anti-Sinn-Oligonukleotide sein, die sich zur Expressions-Inhibierung der für Ha3 bzw. CK15 kodierenden Gene eignen. Auch können die Stoffe solche sein, die antagonistisch zu Ha3 bzw. CK15 wirken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel, das sich zur Regulierung der Keratinisierung des Haares eignet. Für die Zusammensetzung eines solchen Mittels gelten vorstehende Ausführungen hinsichtlich der positiven und negativen Regulierung der Keratinisierung des Haares entsprechend.

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zum Verständnis der Keratinisierung des Haares und zu einem möglichen regulierenden Eingreifen dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Basensequenz einer erfindungsgemäßen cDNA sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen (PVP).

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA

Eine erfindungsgemäße cDNA wurde gemäß des "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahrens hergestellt. Dieses Verfahren umfaßt die Isolierung von mRNA aus Hautzellen von whn(+ / +)-Mäusen bzw. nu/nu-Mäusen, die Umschreibung der mRNA in cDNA und die Differenzierung der cDNA, wodurch solche identifiziert wird, die in nu/nu-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird. Insbesondere letztere stellt eine erfindungsgemäße cDNA dar.

A) Sequenz der Oligonukleotidadaptoren

Folgende Oligonukleotidadaptorenpaare wurden für die RDA benötigt:

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

R-Bgl-12: 5'-GATCTGTTCATG-3'

R-Bgl-24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

B) Herstellung von poly A-mRNA aus den miteinander zu vergleichenden Geweben

Zunächst wurde RNA aus der Haut von whn(+ / +)- bzw. nu/nu-Mäusen nach der "Single-Step RNA-Extraction"-Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) gewonnen. Die poly A-mRNA-Frak-tionen aus den beiden RNA-Populationen wurden anschließend mit Hilfe von Dynabeads Oligo(dT) nach dem entsprechenden Protokoll der Firma Dynal isoliert.

C) Synthese doppelsträngiger cDNA

Zur Synthese von doppelsträngiger whn(+ / +)- bzw. nu/nu-cDNA wurde das "Ribo Clone cDNA Synthesis Kit" der Firma Promega verwendet. Jeweils 4 µg poly A-mRNA wurden eingesetzt, um ungefähr 2 µg cDNA zu erhalten.

D) Differenzanalyse

1. Restriktionsverdau der doppelsträngigen cDNAs

- a) Ungefähr 2 µg jeder cDNA wurden in einem 100 µl-Reaktionsansatz mit der Restriktionsendonuklease DpnII 2 h bei 37°C verdaut.
- b) Die Reaktionslösungen wurden anschließend zweimal mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) und einmal mit 100%igem Chloroform extrahiert.
- c) Die in den wäßrigen Phasen der beiden Reaktionsansätze enthaltene DNA wurde jeweils mit 2 µg Glykogen, 50 µl 10 M Ammoniumacetat und 650 µl 100% Ethanol versetzt und 20 min auf Eis gefällt.

Nach 14-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 upm wurde

- 8 -

der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung der alkoholischen Phase wurde die getrocknete DNA in 20 μ l TE-Puffer resuspendiert.

5

2. Ligation der cDNAs an das R-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

a) In einem Reaktionsgefäß wurden vereinigt:

20 μ l geschnittene cDNA (gesamter Reaktionsansatz aus Punkt D)1c)

8 μ g R-Bgl-24

4 μ g R-Bgl-12

6 μ l 10 x Ligase Puffer

x μ l Wasser

57 μ l Endvolumen

b) Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research) auf 50°C erhitzt, 1 min auf dieser Temperatur gehalten und dann im Laufe einer Stunde wieder auf 10°C abgekühlt (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

c) Nach Hinzufügen von 3 μ l T4 DNA Ligase (1 U/ μ l) wurde das Gemisch über Nacht bei 16°C inkubiert.

3. Synthese von "Repräsentationen" der miteinander zu vergleichenden cDNA-Populationen

a) Zur Generierung sog. "Repräsentationen" der ligierten cDNAs wurde zunächst das Volumen der Ligationsansätze aus Punkt 2c) durch Zugabe von jeweils 140 μ l Wasser auf 200 μ l ergänzt.

Aus dieser verdünnten Lösung wurden dann pro cDNA-Population

- 9 -

(whn(+ / +)- bzw. nu/nu-Haut) 30 Reaktionen zu jeweils 200 μ l angesetzt.

Einem solchen Ansatz wurden der Reihe nach folgende Reaktanden zugegeben:

143 μ l Wasser
20 μ l 10x PCR-Puffer
20 μ l 2 mM dNTPs
10 μ l 25 mM Mg-Chlorid
2 μ l R-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)
4 μ l verdünnter Ligationsansatz

b) PCR:

3 min: 72°C
Hinzufügen von 1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)
20 x: 5 min: 95°C
3 min: 72°C
zuletzt: Abkühlen auf 4°C.

c) Zur Aufbereitung der Reaktionslösungen wurden jeweils 4 Reaktionsansätze in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x mit jeweils 700 μ l Phenol/Chloroform (1:1), 1 x mit Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 75 μ l 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,3) und 800 μ l 2-Propanol zu jedem Reaktionsgefäß, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5 μ g/ μ l resultierte.

- 10 -

4. Restriktionsverdau der "Repräsentationen"

- a) Zur Entfernung der R-Bgl-Oligonukleotidadaptoren wurden 300 μg jeder Repräsentation (whn(+ / +)-Haut bzw. nu/nu-Haut) einem Restriktionsverdau unterzogen. Es wurde nach Zugabe der folgenden Reaktanden 4 h bei 37°C inkubiert:

600 μl cDNA-Repräsentation (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

140 μl 10 x DpnII-Puffer

100 μl DpnII (10 U/ μl)

560 μl Wasser.

- b) Der Restriktionsverdau-Ansatz wurde vor dessen Aufbereitung auf 2 Gefäße aufgeteilt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 70 μl 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 700 μl 2-Propanol zu jedem Gefäß, 20 min Eis;

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ resultierte.

Die so erhaltene, DpnII-verdaute whn(+ / +)-Haut-cDNA-Repräsentation stellte die in der subtraktiven Hybridisierung einzusetzende Driver-DNA-Population dar.

5. Synthese der Tester-DNA-Population

- a) 20 μg der mit DpnII verdauten nu/nu-Haut-cDNA-Repräsentation (= Tester-DNA) wurden in einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt:

40 μl Tester-DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

50 μl Te-Puffer

10 μl 10 x Loading Buffer

- 11 -

wurden auf ein 1,2% Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Es wurde solange Spannung an das Gel gelegt, bis die Bromphenolblau-Komponente des Loading Buffers ungefähr 2 cm weit gewandert war.

- 5 b) Anschließend wurden die Repräsentations-DNA enthaltenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kits" der Firma Boehringer Mannheim eluiert.

10 Die DNA-Extrakte wurden vereinigt, so daß insgesamt 60 μ l Lösung erhalten wurden. Die Konzentration dieser Lösung wurde durch Elektrophorese von 5 μ l in einem 1% Agarose-Gel abgeschätzt.

- 15 c) Zuletzt erfolgte eine Ligation der Tester-DNA mit dem J-Oligonukleotid-Paar:

2 μ g Tester-DNA-Eluat
6 μ l 10 x Ligase Puffer
4 μ l J-Bgl-24 (2 μ g/ μ l)
4 μ l J-Bgl-12 (1 μ g/ μ l)
x μ l Wasser

20 57 μ l Endvolumen

- 25 d) Überführung des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

1 min: 50°C

Abkühlen auf 10°C in 1 h (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

- 25 e) Nach Hinzufügen von 3 μ l T4 DNA Ligase (1 U/ μ l) Inkubation bei 16°C über Nacht.

- 30 f) Einstellung der Konzentration der Tester-DNA auf ungefähr 10 ng/ μ l durch Zugabe von 120 μ l Wasser.

6. Subtraktive Hybridisierung

5 a) 80 μ l Driver-DNA (40 μ g) aus Schritt 4. und 40 μ l (0,4 μ g) verdünnte, mit J-Oligonukleotiden ligierte Tester-DNA aus Schritt 5. wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 2 x mit Phenol/-Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform 100% extrahiert.

10 b) Fällung durch Zugabe von 30 μ l 10 M Ammoniumacetat, 380 μ l Ethanol 100%; 10 min -70°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Anschließend: 2 x Waschen des Pellets mit Ethanol 70%, kurze Zentrifugation nach jedem Waschschrift; Trocknen des DNA-Pellets.

15 c) Die Resuspension der DNA erfolgte in 4 μ l EE x3-Puffer (30 mM EPPS, pH 8,0 bei 20°C (Firma Sigma), 3 mM EDTA) - hierbei wurde ungefähr 2 min auf- und abpipettiert, dann 5 min auf 37°C erwärmt, kurz "gevortext" und zuletzt die Lösung durch Zentrifugieren wieder am Gefäßboden vereinigt. Zuletzt wurde die Lösung
20 mit 35 μ l Mineralöl überschichtet.

d) Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

5 min: 98°C,

Abkühlen auf 67°C und sofortige Zugabe von 1 μ l 5 M NaCl zur
25 DNA,

20 h Inkubation bei 67°C.

7. Synthese des ersten Differenzprodukts

30 a) Nachdem das Mineralöl möglichst vollständig entfernt worden war, wurde die DNA schrittweise verdünnt:

1. Zugabe von 8 μ l TE (+ 5 μ g/ μ l Hefe-RNA),

- 13 -

2. Zugabe von 25 μ l TE - danach gründliches Mischen,
3. Zugabe von 362 μ l TE - Vortex.

b) Für jede subtraktive Hybridisierung wurden 4 PCRs angesetzt. Pro Reaktion:

127 μ l Wasser

20 μ l 10 x Puffer

20 μ l 2 mM dNTPs

5 μ l 25 mM Mg-Chlorid

20 μ l verdünnte Hybridisierungslösung (aus Schritt 7a))

c) PCR-Programm:

3 min: 72°C

Zugabe von 1 μ l Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)

5 min: 72°C

Zugabe von 2 μ l Primer J-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)

10 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C

zuletzt: 10 min: 72°C; dann Abkühlen auf Raumtemperatur.

d) Die 4 Reaktionsansätze wurden in einem 1,5 ml-Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Nach Zugabe von 2 μ g Glykogen Carrier:

Fällung mit 75 μ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 μ l 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Nach Trocknen der DNA Resuspension in 40 μ l Wasser.

e) 20 μ l der resuspendierten DNA aus d) wurden einem "Mung Bean Nuclease-Verdau" (=MBN) unterzogen:

20 μ l DNA

- 14 -

4 μ l 10 x Mung Bean Nuclease Buffer (Fa. NEB)
14 μ l Wasser
2 μ l Mung Bean Nuclease (10 U/ μ l; Fa. NEB)
35 min, 30°C.

5

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160 μ l 50 mM Tris-HCl (pH 8,9) und 5-minütige Inkubation bei 98°C abgebrochen. Anschließend wurde das Gefäß bis zum nächsten Schritt auf Eis gesetzt.

10

- f) Während der MBN-Inkubation wurden 4 weitere PCRs angesetzt (auf Eis):

127 μ l Wasser
20 μ l 2 mM dNTPs
10 μ l 25 mM Mg-Chlorid
2 μ l J-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)
20 μ l MBN-verdaute DNA.

15

- g) PCR-Programm:

1 min: 95°C

20

Abkühlenlassen auf 80°C, Zugabe von 1 μ l Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l),

18 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C,

zuletzt: 10 min: 72°C; Abkühlenlassen auf 4°C.

25

- h) Die 4 PCR-Ansätze wurden in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 75 μ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 μ l 2-Propanol, 20 min Eis.

30

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Resuspension der DNA in 100 μ l Wasser (resultierende Konzen-

- 15 -

tration: $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$); die auf diese Weise erhaltene Lösung stellte das erste Differenzprodukt dar.

8. Austausch der Oligonukleotidadaptoren des Differenzprodukts

5

- a) Entfernung der Oligonukleotidadaptoren durch Restriktionsverdau mit DpnII:

40 μl Differenzprodukt 1 ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)

30 μl 10 x DpnII Puffer

15 μl DpnII (10 U/ μl)

215 μl Wasser

10

2 h 37°C .

15

- b) Aufarbeitung des Reaktionsansatzes:

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 33 μl 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 μl Ethanol 100%,
20 min -20°C .

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C .

20

Waschen des Pellets in Ethanol 70% und Resuspension in 40 μl Wasser.

25

- c) Ligation des Differenzprodukts an N-Bgl-Oligonukleotidadaptoren-paar

1 μl der aufgearbeiteten DNA-Lösung aus Schritt b) wurde mit 9 μl Wasser zu einer Konzentration von 50 ng/ μl verdünnt; 4 μl dieser Lösung wurden in folgender Reaktion eingesetzt:

4 μl DpnII verdautes Differenzprodukt 1 (200 ng)

6 μl 10 x Ligase Puffer

30

2,5 μl N-Bgl-24 ($3,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)

2 μl N-Bgl-12 ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)

42,5 μl Wasser.

- 16 -

- d) Nach Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:
1 min: 50°C,
Abkühlenlassen innerhalb einer Stunde auf 10°C (ramp rate:
0,1°C/9 sec).
- e) Nach Hinzugeben von 3 µl T4 DNA Ligase (1 µl/µl), Inkubation bei
16°C über Nacht.

9. Synthese des 2. Differenzprodukts

Der Ligationsansatz aus Schritt 8e) wurde durch Zugabe von 100 µl Wasser auf eine Konzentration von 1,25 ng/µl verdünnt. 40 µl dieser Verdünnung (50 ng) wurden mit 80 µl Driver-DNA (siehe Punkt 4.) gemischt und erneut gemäß den Schritten 6. bis 8. behandelt. Beim Wechsel der Oligonukleotidadaptoren (Schritt 8.) wurden dieses Mal die J-Bgl-Oligonukleotide an das neu entstandene Differenzprodukt 2 ligiert.

10. Synthese des 3. Differenzprodukts

Die Konzentration des mit den J-Bgl-Oligos ligierten Differenzprodukts 2 wurde auf eine Konzentration von 1 ng/µl reduziert. 10 µl dieser Lösung wurden wiederum mit 990 µl Wasser (+ 30 µg Hefe-RNA) verdünnt, so daß die Konzentration nunmehr 10 pg/µl betrug. Die subtraktive Hybridisierung wurde mit 100 pg (10 µl) J-ligiertem Differenzprodukt 2 und 40 µg (80 µl) Driver-DNA aus Schritt 4.) durchgeführt. Ansonsten wurde wie beim 1. und 2. Differenzprodukt nach den Schritten 6. bis 8. vorgegangen. Eine Ausnahme bildete die PCR nach der MBN-Reaktion (Punkt 7.g) - hier wurden nur 18 statt 22 Cycles durchgeführt.

11. Klonierung des 3. Differenzprodukts

Das 3. Differenzprodukt wurde zunächst einem Restriktionsverdau mit

- 17 -

DpnII unterzogen, wodurch die Oligonukleotidadaptoren entfernt wurden. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend auf ein TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die getrennten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in einen mit BamHI geschnittenen Vektor (pBS Not) kloniert.

12. Charakterisierung der Differenzprodukte

Um zu bestätigen, daß es sich bei den klonierten DNA-Fragmenten nicht um Methodenartefakte handelte, sondern um Sequenzen, die tatsächlich in den untersuchten DNA-Repräsentationen enthalten waren, wurden Southern Analysen durchgeführt, bei denen die untersuchten cDNA-Repräsentationen mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert wurden.

Anschließend wurden diejenigen DNA-Fragmente, die sich in der Southern Analyse als "echte" Differenzprodukte erwiesen hatten, mittels Northern Hybridisierungen untersucht: es wurden RNAs aus den untersuchten Geweben (whn(+/+)-Haut-cDNA und nu/nu-Haut-cDNA) geblottet und mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert. Hierdurch wurde die differentielle Expression dieser Sequenzen in den untersuchten Geweben bestätigt. Eine Analyse der Sequenzen ergab die erfindungsgemäße cDNA von Fig. 1.

Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (PVP)

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (PVP) wird der Vektor pBSNot-PVP von Beispiel 1 mit BamHI gespalten, die für (PVP) kodierende DNA isoliert und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Quiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQ/PVP erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungs-

gemäßen (PVP) von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/PVP wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Quiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

So kann ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden.

Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 25 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

5

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wird wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

10

15

20

So können erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

25

Pro Immunisierung werden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

30

- 20 -

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden so erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

5

Pro Immunisierung werden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

10

Tag 0:	1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28:	2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56:	3. Immunisierung (icFA)
Tag 84:	4. Immunisierung (PBS)
Tag 87:	Fusion


15

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden so nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Protease-verwandtes Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt,
5
2. DNA, kodierend für ein Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
 - 10 (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
15
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
20
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1.
7. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 und der DNA nach Anspruch 2 sowie des Antikörpers nach Anspruch 6 zum Nachweis der Keratinisierung des Haares.
25
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur negativen Regulierung der Keratinisierung des Haares.
- 30 9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Protein als solches oder in Form einer es exprimierenden Nukleinsäure vorliegt.

- 22 -

10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9, wobei ferner Stoffe eingesetzt werden, welche die Proteine Ha3 und/oder CK15 inhibieren.
- 5 11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Stoffe gegen Ha3 bzw. CK15 gerichtete Antikörper und/oder Anti-Sinn-Oligonukleotide sind, welche die Expression der diese Proteine kodierenden Nukleinsäuren inhibierenden.
- 10 12. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur positiven Regulierung der Keratinisierung des Haares.
- 10  13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Protein in Form eines es inhibierenden Stoffes vorliegt.
- 15 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der Stoff ein Antikörper nach Anspruch 6 und/oder ein Anti-Sinn-Oligonukleotid ist, das die Expression der das Protein kodierenden Nukleinsäure inhibiert.
- 20 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei ferner die Proteine Ha3 und/oder CK15 als solche oder in Form von sie exprimierenden Nukleinsäuren vorliegen.

K 2398

Zusammenfassung

5

Protease-verwandtes Protein

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protease-verwandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper und antagonistische Substanzen.

15

Fig. 1

Fortsetzung von Fig. 1

S	W	G	D	M	P	C	G	S	K	E	K	P	G	232
TCA	TGG	GGT	GAC	ATG	CCC	TGT	GGA	TCA	AAG	GAG	AAG	CCA	GGA	756

V	Y	T	D	V	C	T	H	I	R	W	I	Q	N	246
GTT	TAC	ACC	GAT	GTC	TGC	ACT	CAT	ATC	AGA	TGG	ATC	CAA	AAC	798

I	L	R	N	K	W	L								253
ATC	CTC	AGA	AAC	AAG	TGG	CTG	TGA	-3'						840

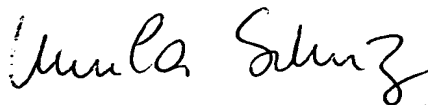
CERTIFICATE OF VERIFICATION

I, Ursula Scherz of Schlesierstr. 8, 81669 München,
Germany,

state that the attached document is a true and complete
translation to the best of my knowledge of the German
patent application 197 36 298.6.

Dated: March 28, 2001

Signature of Translator:



URSULA SCHERZ

Translator for the English
language duly registered,
commissioned and sworn in
by the München I Regional Court

Seitliche und beid-

Certified translation of a priority document

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

(coat of arms)

**Certification of Priority on the Filing of a Patent
Application**

File No.: 197 36 198.6

Date of Filing: August 20, 1997

Applicant/Patentee: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts,
Heidelberg, Neckar/Germany

Title: Protease-Related Protein

IPC: C 07 K, A 61 K, C 12 N

**The attached sheets are a true and exact reproduction of
the original documents of this patent application.**

München, March 2, 2001

German Patent and Trademark Office

The President

Seal:

by order

German Patent and

(signature)

Trademark Office

Sieck

Applicant: Deutsches Krebsforschungszentrum
"Protease-Related Protein"
Attorney's File: K 2398 - hu / km

The present invention relates to a protease-related protein, a DNA encoding the same and a process for the preparation thereof. In addition, this invention concerns the use of the DNA and the protein as well as antibodies directed against the protein.

A hair anomaly is frequently due to an impaired keratinization of hair. It is known from investigations made with naked mice that the gene product of a gene referred to as whn is important for the keratinization of hair. This gene product is a transcription factor. However, its target genes are not known. In so far, it is not possible to interfere with the keratinization of hair. However, this would be desirable, particularly if the keratinization of the hair is impaired.

Therefore, it is the object of the present invention to provide a product by which the keratinization of hair can be investigated and optionally be regulated.

According to the invention this is achieved by the subject matters defined in the claims.

Thus, the subject matter of the present invention is represented by a protease-related protein, the protein comprising the amino acid sequence of fig. 1 or an amino acid sequence differing therefrom by one or more amino acids.

The present invention is based on the applicant's finding that the gene product of the whn gene is responsible for regulating the expression of at least three genes. Two of these genes code for the known keratins Ha3 (cf. Winter, H. et al., Exp. Cell Res. 212 (1994), 190-200) and CK15 (cf. Nozaki, M. et al., Gene 138 (1994), 197-200), respectively.

The third gene codes for a protein which has homologies with respect to a protease of the kallikrein family, optionally a protease activity, but differs from a known protease of the kallikrein family on the DNA level by hybridization under normal conditions. Such a protein has the amino acid sequence of fig. 1 or an amino acid sequence differing therefrom by one or more amino acids. Furthermore, the applicant has found that when the gene product of the whn gene is lacking the genes of Ha3 and CK15 are underexpressed whereas the gene of the above protein is overexpressed.

The above protein is referred to as "protease-related protein" (PVP) in the present invention.

Another subject matter of the present invention relates to a nucleic acid coding for a (PVP). This may be an RNA or a DNA. The latter may be a genomic DNA or a cDNA, for example. Preferred is a DNA comprising the following:

- (a) the DNA of fig. 1 or a DNA differing therefrom by one or more base pairs,
- (b) a DNA hybridizing with the DNA of (a), or
- (c) a DNA related to the DNA of (a) or (b) via the degenerated genetic code.

The expression "hybridizing DNA" refers to a DNA which hybridizes with a DNA of (a) under normal conditions, particularly at 20°C below the melting point of the DNA.

A section of the DNA of fig. 1 was deposited with the DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* [German-type collection of microorganisms and cell cultures]) as pRDA2-1a under DSM 11522 on April 23, 1997.

A DNA according to the invention is described below in the form of a cDNA. It stands as an example for every DNA falling under the present invention.

For the production of a cDNA according to the invention it is favorable to isolate mRNA from skin cells of whn(+/-) mice and nu/nu(whn(-/-)) mice, respectively, to transcribe the mRNA into cDNA and subject the cDNA to a "representational difference analysis" (RDA) method (cf. Hubank, M. and Schatz, D., Nucleic Acids Research 22 (1994), 5640-5648) so as to identify that cDNA which is underexpressed and overexpressed, respectively, in nu/nu mice as compared to whn(+/-) mice. In particular the latter cDNA represents a cDNA according to the invention.

A cDNA according to the invention may be present in a vector and expression vector, respectively. A person skilled in the art is familiar with examples thereof. In the case of an expression vector for E. coli, these are e.g. pGEMEX, pUC derivatives, pGEX-2T, pET3b and pQE-8. For the expression in yeast, pY100 and Ycpad1 have to be mentioned as examples, while for the expression in animal cells, e.g. pKCR, pEFBOS, cDM8 and pCEV4 have to be indicated. For the expression in insect cells, the baculo virus expression vector pAcSGHisNT-A is especially suitable.

The person skilled in the art is familiar with suitable cells to express a cDNA according to the invention, which is present in an expression vector. Examples of such cells comprise the E. coli strains HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 and SG 13009, the yeast strain *saccharomyces cerevisiae* and the animal cells Ltk, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero and HeLa as well as the insect cells sf9.

The person skilled in the art knows in which way a cDNA according to the invention has to be inserted in an expression vector. He is also familiar with the fact that this DNA can be inserted in connection with a DNA coding for another protein and peptide, respectively, so that the

cDNA according to the invention can be expressed in the form of a fusion protein.

In addition, the person skilled in the art is familiar with conditions of cultivating transformed cells and transfected cells, respectively. He also knows processes serving for isolating and purifying the protein expressed by the cDNA according to the invention. Thus, such a protein which may also be a fusion protein represents a subject matter of the present invention as well.

Another subject matter of the present invention relates to an antibody directed against an above protein and fusion protein, respectively. Such an antibody may be prepared by conventional processes. It may be polyclonal and monoclonal, respectively. For its preparation it is favorable to immunize animals, particularly rabbits or chickens for a polyclonal antibody and mice for a monoclonal antibody, with an above (fusion) protein or fragments thereof. Further boosters of the animals can be effected with the same (fusion) protein or fragments thereof. The polyclonal antibody may then be obtained from the animals' serum and yolk, respectively. For the monoclonal antibody, spleen cells from the animals are fused with myeloma cells.

The present invention enables to investigate the keratinization of hair. (PVP) can be detected in cells, particularly skin cells, by means of an antibody according to the invention. A relation between (PVP) and the keratinization of hair can be established. Moreover, it is possible to detect by means of a (PVP) according to the invention an autoantibody directed against this protein. Both detections may be made by conventional processes, particularly a Western blot, an ELISA, an immunoprecipitation or by immunofluorescence. Furthermore, the expression of the gene coding for (PVP) can be detected by a nucleic acid according to the invention, particularly

a DNA and primers derived therefrom. This detection can be carried out as usual, particularly in a Southern blot.

In addition, the present invention is suited to interfere in regulating fashion with the keratinization of hair. This regulation may be positive or negative. A positive regulation is understood to mean one by which an impaired keratinization of hair can be encountered. A negative regulation would exist if a normal or strong keratinization of hair was reduced.

For a positive regulation of the keratinization of hair it is an obvious thing to use (PVP) in the form of a substance inhibiting it. This substance may be an antibody according to the invention. Furthermore, it may be an anti-sense oligonucleotide which is suited for the expression inhibition of the gene coding for (PVP). Moreover, the substance may be a substance which has an antagonistic effect with respect to (PVP). It may be advantageous to use several substances. It may be especially favorable to use additionally one or more of the proteins Ha3 and CK15 as such or in the form of nucleic acids expressing them.

For a negative regulation of the keratinization of hair, it is an obvious thing to use (PVP) as such or in the form of a nucleic acid expressing it. It may be advantageous to use additionally one or more of the proteins Ha3 and CK15 in the form of substances inhibiting them. Such substances may be antibodies directed against Ha3 and CK15, respectively, or anti-sense oligonucleotides, which are suited for the expression inhibition of the genes coding for Ha3 and CK15, respectively. The substances may also be those which have an antagonistic effect with respect to Ha3 and CK15, respectively.

Another subject matter of the invention relates to a product which is suited for regulating the keratinization of hair. For the composition of such a product the above

statements made on the positive and negative regulations of the keratinization of hair apply correspondingly.

Thus, the present invention represents a major contribution to the understanding of the keratinization of hair and a possible regulating interference.

Brief description of the drawing:

Fig. 1 shows the base sequence of a cDNA according to the invention as well as the amino acid sequence, derived therefrom, of a (PVP) according to the invention.

The present invention is explained by the below examples.

Example 1: Preparation of a cDNA according to the invention

A cDNA according to the invention was prepared according to the "representational difference analysis" (RDA) method. This method comprises the isolation of mRNA from skin cells of whn(+/+) mice and nu/nu mice, respectively, the transcription of the mRNA into cDNA, and the differentiation of the cDNA so as to identify that which is underexpressed and overexpressed, respectively, in nu/nu mice. In particular, the latter represents a cDNA according to the invention.

A) Sequence of the oligonucleotide adaptors

The following oligonucleotide adaptor pairs were required for the RDA:

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

R-Bgl-12: 5'-GATCTGTTTCATG-3'

R-Bgl-24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

B) Preparation of poly A-mRNA from the tissues to be compared with one another

RNA was initially obtained from the skin of whn(+/+) mice and nu/nu mice, respectively, according to the "single step RNA extraction" method (Chomczynski and Sacchi, 1987). Thereafter, the poly A-mRNA fractions from the two RNA populations were isolated by means of dynabeads oligo(dT) according to the corresponding protocol from the Dynal company.

C) Synthesis of double-stranded cDNA

The "ribo clone cDNA synthesis kit" from the company of Promega was used for the synthesis of double-stranded whn(+/+) cDNA and nu/nu cDNA, respectively. 4 µg of poly A-mRNA were used each to obtain about 2 µg cDNA.

D) Difference analysis

1. Restriction digest of the double-stranded cDNAs
 - a) About 2 µg of each cDNA were digested in a 100 µl reaction batch by the restriction endonuclease DpnII at 37°C for 2 h.
 - b) The reaction solutions were then extracted twice with a phenol/chloroform mixture (1:1) and once with 100 % chloroform.
 - c) The DNA included in the aqueous phases of the two reaction batches was admixed with 2 µg glycogen,

50 μ l 10 M ammonium acetate and 650 μ l 100 % ethanol each and precipitated on ice for 20 min.

After 14 minutes of centrifugation at 4°C and with 14000 rpm, the supernatant was discarded and the DNA pellet was washed with 70 % ethanol. After another centrifugation and removal of the alcoholic phase, the dried DNA was resuspended in 20 μ l TE buffer.

2. Ligation of the cDNAs to the R-Bgl oligonucleotide adaptor pair

a) A reaction vessel was used to combine the following:

20 μ l cut cDNA (total reaction batch from item D)1c)

8 μ g R-Bgl-24

4 μ g R-Bgl-12

6 μ l 10 x ligase buffer

x μ l water

57 μ l final volume

b) The reaction batch was heated in a thermocycler (Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research) to 50°C, kept at this temperature for 1 min and then cooled again to 10°C in the course of one hour (ramp rate: 0.1°C/9 sec).

c) After adding 3 μ l T4 DNA ligase (1 U/ μ l), the mixture was incubated at 16°C overnight.

3. Synthesis of "representations" of the cDNA populations to be compared with one another

a) For generating what is called "representations" of the ligated cDNAs, the volume of the ligation batches from item 2c) was initially supplemented

by the addition of 140 μ l water each to give 200 μ l.

Then, 30 reactions of 200 μ l each were prepared from this dilute solution per cDNA population (whn(+/ $\bar{+}$) skin and nu/nu skin, respectively).

The following reactants were added successively to such a batch:

143 μ l water
20 μ l 10x PCR buffer
20 μ l 2 mM dNTPs
10 μ l 25 mM Mg chloride
2 μ l R-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)
4 μ l dilute ligation batch

b) PCR:

3 min: 72°C
addition of 1 μ l Taq-DNA polymerase (5 U/ μ l)
20 x: 5 min: 95°C
3 min: 72°C
finally: cooling to 4°C.

c) For preparing the reaction solutions, 4 reaction batches each were combined in a vessel.

extraction: 2 x with 700 μ l phenol/chloroform (1:1) each, 1 x with chloroform 100 %;

precipitation: addition of 75 μ l 3 M Na-acetate solution (pH 5.3) and 800 μ l 2-propanol to each reaction vessel, 20 min on ice.

centrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Washing of the DNA pellet with ethanol 70 % and resuspension in such an amount of water that a concentration of 0.5 μ g/ μ l resulted.

4. Restriction digest of the "representations"

- a) For removing the R-Bgl oligonucleotide adaptors, 300 μg of each representation (whn(+/-) skin and nu/nu skin, respectively) were subjected to a restriction digest. Following the addition of the below reactants, incubation was carried out at 37°C for 4 h:

600 μl cDNA representation (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

140 μl 10 x DpnII buffer

100 μl DpnII (10 U/ μl)

560 μl water.

- b) The restriction digest batch was distributed to 2 vessels prior to its preparation.

Extraction: 2 x phenol/chloroform (1:1), 1 x chloroform 100 %;

precipitation: addition of 70 μl 3 M Na-acetate (pH 5.3), 700 μl 2-propanol to each vessel, 20 min on ice;

centrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Washing of the DNA pellet with ethanol 70 % and resuspension in such an amount of water that a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ resulted.

The resulting DpnII-digested whn(+/-) skin-cDNA representation represented the driver-DNA population to be used in the subtractive hybridization.

5. Synthesis of the tester DNA population

- a) 20 μg of the nu/nu skin-cDNA representation digested with DpnII (= tester DNA) were separated electrophoretically in a TAE gel:

40 μl tester DNA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

50 μl TE buffer

10 μl 10 x loading buffer

were applied to a 1.2 % agarose TAE gel. A voltage was applied to the gel until the bromophenol blue component of the loading buffer had migrated about 2 cm.

- b) Thereafter, the bands containing the representation DNA were cut out of the gel and eluted by means of the "agarose gel DNA extraction kit" from the company of Boehringer Mannheim.

The DNA extracts were purified, so that a total of 60 μ l of solution was obtained. The concentration of this solution was evaluated by electrophoresis of 5 μ l in a 1 % agarose gel.

- c) Finally, the tester DNA was ligated with the J oligonucleotide pair:

2 μ g tester DNA eluate
6 μ l 10 x ligase buffer
4 μ l J-Bgl-24 (2 μ g/ μ l)
4 μ l J-Bgl-12 (1 μ g/ μ l)
x μ l water
57 μ l final volume

- d) Transfer of the reaction batch into thermocycler:
1 min: 50°C
cooling to 10°C within 1 h (ramp rate: 0.1°C/9 sec).

- e) After adding 3 μ l T4 DNA ligase (1 U/ μ l), incubation at 16°C overnight.

- f) Adjusting the concentration of the tester DNA to approximately 10 ng/ μ l by the addition of 120 μ l water.

6. Subtractive hybridization

- a) 80 μ l of driver DNA (40 μ g) from step 4. and 40 μ l (0.4 μ g) of dilute tester DNA from step 5., ligated with J oligonucleotides, were combined in a reaction vessel and extracted 2 x with phenol/chloroform (1:1) and once with chloroform 100 %.
- b) Precipitation by addition of 30 μ l of 10 M ammonium acetate, 380 μ l of ethanol 100 %; -70°C for 10 min.
Centrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.
Then: 2 x washing of the pellet with ethanol 70 %, short centrifugation after every wash step; drying of the DNA pellet.
- c) The DNA was resuspended in 4 μ l EE x3 buffer (30 mM EPPS, pH 8.0, at 20°C (Sigma company), 3 mM EDTA) - accompanied by pipetting off and on for about 2 min, then heating to 37°C for 5 min, short "vortexing" and finally combining the solution again on the vessel bottom by centrifugation. The solution was eventually covered with a layer consisting of 35 μ l of mineral oil.
- d) Transfer of the reaction batch into thermocycler:
5 min: 98°C,
cooling to 67°C and immediate addition of 1 μ l 5 M NaCl to the DNA,
20 h of incubation at 67°C.

7. Synthesis of the first difference product

- a) After removing the mineral oil as completely as possible, the DNA was diluted step-wise:
 1. addition of 8 μ l TE (+ 5 μ g/ μ l yeast RNA)
 2. addition of 25 μ l TE - thereafter thorough mixing
 3. addition of 362 μ l TE - vortex.
- b) 4 PCRs were prepared for every subtractive hybridization. Per reaction:
127 μ l water
20 μ l 10 x buffer
20 μ l 2 mM dNTPs
5 μ l 25 mM Mg chloride
20 μ l dilute hybridization solution (from step 7a))
- c) PCR program:
3 min: 72°C
addition of 1 μ l Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)
5 min: 72°C
addition of 2 μ l primer J-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)
10 x: 1 min: 95°C
3 min: 70°C
finally: 10 min: 72°C, then cooling to room temperature
- d) The 4 reaction batches were combined in a 1.5 ml vessel.
extraction: 2 x phenol/chloroform (1:1), 1 x chloroform 100%.
After the addition of 2 μ g glycogen carrier:
Precipitation with 75 μ l 3 M Na acetate (pH 5.3), 800 μ l 2-propanol, 20 min on ice.
Centrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.
Washing of the DNA pellet with ethanol 70 %.

After drying of the DNA, resuspension in 40 μ l water.

- e) 20 μ l of the resuspended DNA from d) were subjected to a "mung bean nuclease digest" (MBN):
20 μ l DNA
4 μ l 10 x mung bean nuclease buffer (NEB company)
14 μ l water
2 μ l mung bean nuclease (10 U/ μ l; NEB company)
35 min, 30°C.

The reaction was discontinued by the addition of 160 μ l 50 mM Tris-HCl (pH 8.9) and 5 minutes of incubation at 98°C. Thereafter, the vessel was placed on ice up to the next step.

- f) During the MBN incubation, 4 further PCRs were prepared (on ice):
127 μ l water
20 μ l 2 mM dNTPs
10 μ l 25 mM Mg chloride
2 μ l J-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)
20 μ l MBN-digested DNA.

- g) PCR program:
1 min: 95°C
allowing to cool to 80°C, addition of 1 μ l Taq DNA polymerase (5 U/ μ l),
18 x: 1 min: 95°C
3 min: 70°C,
finally: 10 min: 72°C; allowing to cool to 4°C.

- h) The 4 PCR batches were combined in a vessel.
Extraction: 2 x phenol/chloroform (1:1), 1 x chloroform 100 %.
Precipitation: 75 μ l 3 M Na-acetate (pH 5.3), 800 μ l 2-propanol, 20 min on ice.
Centrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Washing of the DNA pellet with ethanol 70 %.

Resuspension of the DNA in 100 μ l water (resulting concentration: 0.5 μ g/ μ l); the solution obtained in this way represented the first difference product.

8. Exchange of the oligonucleotide adaptors of the difference product

- a) Removal of the oligonucleotide adaptors by restriction digest with DpnII:

40 μ l difference product 1 (0.5 μ g/ μ l)

30 μ l 10 x DpnII buffer

15 μ l DpnII (10 U/ μ l)

215 μ l water

37°C for 2 h.

- b) Preparing the reaction batch:

Extraction: 2 x phenol/chloroform (1:1), 1 x chloroform 100 %.

Precipitation: 33 μ l 3 M Na-acetate (pH 5.3), 800 μ l ethanol 100 %, 20 min, -20°C.

Centrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Washing of the pellet in ethanol 70 % and resuspension in 40 μ l water.

- c) Ligation of the difference product to N-Bgl oligonucleotide adaptor pair

1 μ l of the prepared DNA solution from step b) was diluted with 9 μ l water to give a concentration of 50 ng/ μ l; 4 μ l of this solution were used in the following reaction:

4 μ l DpnII-digested difference product 1 (200 ng)

6 μ l 10 x ligase buffer

2.5 μ l N-Bgl-24 (3.5 μ g/ μ l)

2 μ l N-Bgl-12 (2 μ g/ μ l)

42.5 μ l water.

- d) After the transfer of the reaction batch into thermocycler:
1 min: 50°C,
allowing to cool to 10°C within one hour (ramp rate: 0.1°C/9 sec).
- e) After adding 3 μ l T4 DNA ligase (1 μ g/ μ l),
incubation at 16°C overnight.

9. Synthesis of the 2nd difference product

The ligation batch from step 8e) was diluted by adding 100 μ l water to a concentration of 1.25 ng/ μ l. 40 μ l of this dilution (50 ng) were mixed with 80 μ l driver DNA (see item 4.) and treated again according to steps 6. to 8. When the oligonucleotide adaptors (step 8.) were changed, the J-Bgl oligonucleotides were ligated in this case to the newly formed difference product 2.

10. Synthesis of the 3rd difference product

The concentration of the difference product 2 ligated with the J-Bgl oligos was reduced to a concentration of 1 ng/ μ l. 10 μ l of this solution were diluted again with 990 μ l water (+ 30 μ g yeast-RNA), so that the concentration was then 10 pg/ μ l. The subtractive hybridization was carried out with 100 pg (10 μ l) J-ligated difference product 2 and 40 μ g (80 μ l) driver DNA from step 4. As for the rest, the procedure was carried out as in the case of the 1st and 2nd difference products according to steps 6. to 8. The PCR according to the MBN reaction (item 7.g) formed an exception - here only 18 cycles in place of 22 ones were carried out.

11. Cloning of the 3rd difference product

The 3rd difference product was initially subjected to a restriction digest with DpnII so as to remove the oligonucleotide adaptors. The reaction product was then applied to a TAE gel and separated electrophoretically. The separated DNA bands were cut out of the gel, the DNA was eluted and cloned into a vector cut with BamHI (pBS Not).

12. Characterization of the difference products

In order to confirm that the cloned DNA fragments were not method artifacts but sequences which were actually included in the investigated DNA representations, Southern analyses were carried out in which the investigated cDNA representations were hybridized with the radioactively labeled cloning products.

Thereafter, those DNA fragments which proved to be "real" difference products in the Southern analysis, were investigated by means of Northern hybridizations: RNAs from the investigated tissues (whn(+/-) skin-cDNA and nu/nu skin-cDNA) were blotted and hybridized with the radioactively labeled cloning products. By this, the differential expression of these sequences was confirmed in the investigated tissues. An analysis of the sequences yielded the cDNA of fig. 1 according to the invention.

Example 2: Preparation and purification of a (PVP) according to the invention

For the preparation of a (PVP) according to the invention, the vector pBSNot-PVP of Example 1 is cleaved by BamHI, the DNA coding for (PVP) is isolated and inserted in the expression vector pQE-8 (Quiagen company) cleaved by BamHI. The expression plasmid pQ/PVP is obtained. Such a plasmid

codes for a fusion protein comprising 6 histidine residues (N terminus partner) and the (PVP) of fig. 1 according to the invention (C terminus partner). pQ/PVP is used for transforming E. coli SG 13009 (cf. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273). The bacteria are cultivated in an LB broth with 100 µg/ml ampicillin and 25 µg/ml kanamycin and induced with 60 µM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h. The addition of 6 M guanidine hydrochloride serves for achieving lysis of the bacteria, thereafter a chromatography (Ni-NTA resin) is carried out with the lysate in the presence of 8 M urea corresponding to the instructions of the manufacturer (Quiagen company) of the chromatography material. The bound fusion protein is eluted in a buffer having pH 3.5. After its neutralization, the fusion protein is subjected to an 18 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and dyed with Coomassie blue (cf. Thomas, J.O. and Kornberg, R.D., J. Mol. Biol. 149 (1975), 709-733).

In this way, a (fusion) protein according to the invention can be prepared in highly pure form.

Example 3: Preparation and detection of an antibody according to the invention

A fusion protein of Example 1 according to the invention is subjected to an 18 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After dyeing the gel using 4 M sodium acetate, an about 25 kD long band is cut out of the gel and incubated in phosphate-buffered common salt solution. Gel pieces are sedimented before the protein concentration of the supernatant is determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, which is followed by Coomassie blue dyeing. Animals are immunized with the gel-purified fusion protein as follows:

Immunization protocol for polyclonal antibodies in rabbits

35 µg gel-purified fusion protein in 0.7 ml PBS and 0.7 ml complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant are used per immunization.

day 0: 1st immunization (complete Freund's adjuvant)
day 14: 2nd immunization (incomplete Freund's adjuvant:
icFA)
day 28: 3rd immunization (icFA)
day 56: 4th immunization (icFA)
day 80: bleeding to death

The serum of the rabbit is tested in an immunoblot. For this purpose, a fusion protein of Example 1 according to the invention is subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose filter (cf. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10 (1984), 203-209). The Western blot analysis is carried out as described in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8 (1994), 215-229). For this purpose, the nitrocellulose filter is incubated with a first antibody at 37°C for 1 h. This antibody is the serum of the rabbit (1:10000 in PBS). After several wash steps using PBS, the nitrocellulose filter is incubated with a second antibody. This antibody is a monoclonal goat anti-rabbit-IgG antibody coupled with alkaline phosphatase (Dianova company) (1:5000) in PBS. A 30-minute incubation at 37°C is followed by several wash steps using PBS and then by the alkaline phosphatase detection reaction using developer solution (36 µM 5'-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 400 µM nitro blue tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) at room temperature, until bands are visible.

In this way, the polyclonal antibodies according to the invention can be prepared.

Immunization protocol for polyclonal antibodies in chickens

40 µg gel-purified fusion protein in 0.8 ml PBS and 0.8 ml complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant are used per immunization.

day 0: 1st immunization (complete Freund's adjuvant)
day 28: 2nd immunization (incomplete Freund's adjuvant;
icFA)
day 50: 3rd immunization (icFA)

Antibodies are extracted from yolk and tested in a Western blot. Polyclonal antibodies according to the invention are detected in this way.

Immunization protocol for monoclonal mouse antibodies

12 µg gel-purified fusion protein are used per immunization in 0.25 ml PBS and 0.25 ml complete Freund's adjuvant and incomplete Freund's adjuvant, respectively. The fusion protein was dissolved in 0.5 ml (without adjuvant) in the 4th immunization.

day 0: 1st immunization (complete Freund's adjuvant)
day 28: 2nd immunization (incomplete Freund's adjuvant;
icFA)
day 56: 3rd immunization (icFA)
day 84: 4th immunization (PBS)
day 87: fusion

Supernatants of hybridomas are tested in a Western blot. Monoclonal antibodies according to the invention are detected in this way.

Claims

1. A protease-related protein, the protein comprising the amino acid sequence of fig. 1 or an amino acid sequence differing therefrom by one or more amino acids.
2. A DNA coding for a protein according to claim 1, wherein the DNA comprises:
 - (a) the DNA of fig. 1 or a DNA differing therefrom by one or more base pairs,
 - (b) a DNA hybridizing with the DNA of (a), or
 - (c) a DNA related to the DNA of (a) or (b) via the degenerated genetic code.
3. An expression plasmid comprising the DNA according to claim 2.
4. A transformant containing the expression plasmid according to claim 3.
5. A process for the preparation of the protein according to claim 1, comprising the cultivation of the transformant according to claim 4 under suitable conditions.
6. Antibodies directed against the protein according to claim 1.
7. Use of the protein according to claim 1 and the DNA according to claim 2 as well as the antibody according to claim 6 for detecting the keratinization of hair.
8. Use of the protein according to claim 1 for the negative regulation of the keratinization of hair.

9. Use according to claim 8, wherein the protein is present as such or in the form of a nucleic acid expressing it.
10. Use according to claim 8 or 9, wherein substances are also used which inhibit the proteins Ha3 and/or CK15.
11. Use according to claim 10, wherein the substances are antibodies directed against Ha3 and CK15, respectively, and/or anti-sense oligonucleotides, all of which inhibit the expression of the nucleic acids encoding these proteins.
12. Use of the protein according to claim 1 for the positive regulation of the certification of hair.
13. Use according to claim 12, wherein the protein is present in the form of a substance inhibiting it.
14. Use according to claim 13, wherein the substance is an antibody according to claim 6 and/or an anti-sense oligonucleotide which inhibits the expression of the nucleic acid encoding the protein.
15. Use according to any one of claims 12 to 14, wherein the proteins Ha3 and/or CK15 are also present as such or in the form of nucleic acids expressing them.

Abstract of the Disclosure**Protease-Related Protein**

The present invention relates to a protease-related protein, a DNA encoding the same and a process for the preparation thereof. Furthermore, this invention concerns the use of the DNA and the protein as well as antibodies directed against the protein and antagonistic substances.

5'-	TAG	GTG	GTG	TCA	TTC	CCC	TCC	AAC	CTG	AGT	GCT	GGC	AGG	TAC	42	
								M	P	M	K	M	L	T	M	8
	ACT	GCT	GGC	CAC	CAG	CAG	ATG	CCC	ATG	AAG	ATG	CTG	ACA	ATG	84	
	K	M	L	A	L	C	L	V	L	A	K	S	A	W	22	
	AAG	ATG	CTG	GCC	CTG	TGC	TTG	GTT	CTT	GCT	AAA	TCA	GCC	TGG	126	
	S	E	E	Q	E	K	V	V	H	G	G	P	C	L	36	
	TCG	GAG	GAA	CAG	GAG	AAG	GTG	GTT	CAT	GGA	GGC	CCG	TGT	TTG	168	
	K	D	S	H	P	F	Q	A	A	L	Y	T	S	G	50	
	AAG	GAC	TCC	CAC	CCT	TTC	CAG	GCT	GCC	CTC	TAC	ACC	TCA	GGT	210	
	H	L	L	C	G	G	V	L	I	D	P	Q	W	V	64	
	CAC	TTG	CTG	TGT	GGT	GGG	GTC	CTC	ATT	GAC	CCA	CAG	TGG	GTG	252	
	L	T	A	A	H	C	K	K	P	N	L	Q	V	I	78	
	CTG	ACA	GCT	GCC	CAC	TGC	AAA	AAA	CCG	AAT	CTG	CAG	GTG	ATC	294	
	L	G	K	H	N	L	R	Q	T	E	T	F	Q	R	92	
	TTG	GGG	AAA	CAC	AAC	CTA	CGG	CAA	ACA	GAG	ACT	TTC	CAA	AGG	336	
	Q	I	S	V	D	R	T	I	V	H	P	R	Y	N	106	
	CAA	ATC	TCA	GTG	GAC	AGG	ACT	ATT	GTC	CAT	CCC	CGC	TAC	AAC	378	
	P	E	T	H	D	N	D	I	M	M	V	H	L	K	120	
	CCT	GAA	ACC	CAC	GAC	AAT	GAC	ATC	ATG	ATG	GTG	CAT	CTG	AAA	420	
	N	P	V	K	F	S	K	K	I	Q	P	L	P	L	134	
	AAT	CCA	GTC	AAA	TTC	TCT	AAA	AAG	ATC	CAG	CCT	CTG	CCC	TTG	462	
	K	N	D	C	S	E	E	N	P	N	C	Q	I	L	148	
	AAG	AAT	GAC	TGC	TCT	GAG	GAG	AAT	CCC	AAC	TGC	CAG	ATC	CTG	504	
	G	W	G	K	M	E	N	G	D	F	P	D	T	I	162	
	GGC	TGG	GGC	AAG	ATG	GAA	AAT	GGT	GAC	TTC	CCA	GAT	ACC	ATT	546	
	Q	C	A	D	V	H	L	V	P	R	E	Q	C	E	176	
	CAG	TGT	GCT	GAT	GTC	CAT	CTG	GTG	CCC	CGG	GAG	CAG	TGT	GAG	588	
	R	A	Y	P	G	K	I	T	Q	S	M	V	C	A	190	
	CGT	GCC	TAC	CCT	GGC	AAG	ATC	ACC	CAG	AGC	ATG	GTG	TGC	GCA	630	
	G	D	M	K	E	G	N	D	S	C	Q	G	D	S	204	
	GGC	GAC	ATG	AAA	GAA	GGC	AAC	GAT	TCC	TGT	CAG	GGT	GAT	TCT	672	
	G	G	P	L	V	C	G	G	R	L	R	G	L	V	218	
	GGA	GGT	CCC	CTA	GTA	TGT	GGG	GGT	CGC	CTC	CGA	GGG	CTC	GTG	714	

Fig. 1

Fig. 1 continued

S	W	G	D	M	P	C	G	S	K	E	K	P	G	232
TCA	TGG	GGT	GAC	ATG	CCC	TGT	GGA	TCA	AAG	GAG	AAG	CCA	GGA	756
V	Y	T	D	V	C	T	H	I	R	W	I	Q	N	246
GTT	TAC	ACC	GAT	GTC	TGC	ACT	CAT	ATC	AGA	TGG	ATC	CAA	AAC	798
I	L	R	N	K	W	L								253
ATC	CTC	AGA	AAC	AAG	TGG	CTG	TGA	-3'						840